



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년09월01일  
(11) 등록번호 10-1548491  
(24) 등록일자 2015년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07C 251/86 (2006.01) A61K 31/15 (2006.01)  
A61P 31/04 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2013-0121273  
(22) 출원일자 2013년10월11일  
심사청구일자 2013년10월11일  
(65) 공개번호 10-2015-0042523  
(43) 공개일자 2015년04월21일  
(56) 선행기술조사문헌  
Chemistry of Heterocyclic Compounds (New York, NY, United States), 2008, 44(2), pp.184-189

(73) 특허권자  
건국대학교 산학협력단  
서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)  
대한민국(농촌진흥청장)  
전라북도 전주시 완산구 농생명로 300 (중동)  
(72) 발명자  
강린우  
서울특별시 동대문구 약령시로21길 30 현대아파트 1-1208  
안예진  
서울특별시 동대문구 약령시로21길 30 현대아파트 1-1208  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 8 항

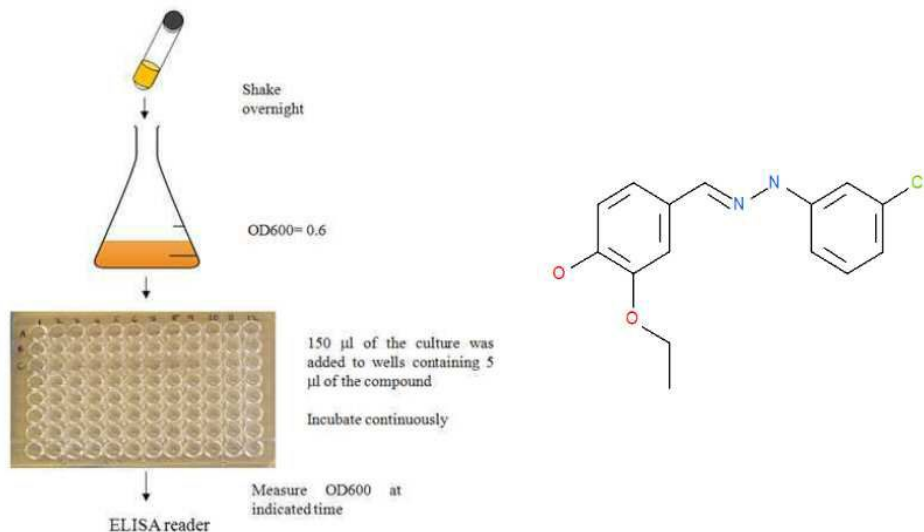
심사관 : 방성철

(54) 발명의 명칭 **신규한 항생활성 화합물 및 그 화합물을 포함하는 항생 조성물**

(57) 요약

본 발명은 신규한 항생활성 화합물 및 그 화합물을 포함하는 항생 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 미생물 지질합성을 저해하는 화합물 및 그 화합물의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

**이병무**

경기도 화성시 동탄지성로 294 참누리2단지아파트  
203-1502

**김정구**

경기도 수원시 팔달구 권광로 373 월드메르디앙  
112-501

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012A0080141

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 [단독](1차)2013 박테리아 타깃 효소 저해를 통한 신규 항생물질 개발 및 화학적 유도체  
합성을 통한 최적화

기여율 1/1

주관기관 건국대학교 산학협력단

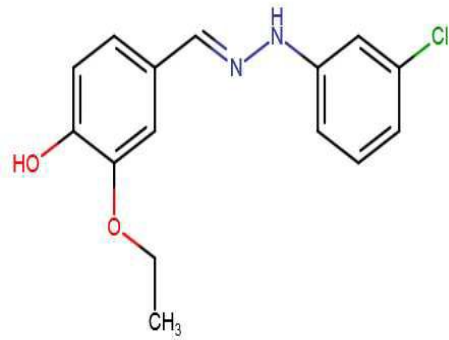
연구기간 2013.02.01 ~ 2013.12.31

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

하기 화학식 1 의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염.



[화학식 1]

**청구항 2**

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 말로닐-CoA: 아실 캐리어 프로틴 트랜스아실레이즈(MCAT) 활성을 저해하는 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염.

**청구항 3**

제1항 또는 제 2항의 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 병원균에 의한 감염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 4**

제 3항에 있어서, 상기 조성물은 미생물 지질 합성 저해 활성을 가지는 병원균에 의한 감염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 5**

제1항 또는 제 2항의 화합물 및 사료학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 병원균에 의한 감염 예방 또는 치료용 사료 조성물.

**청구항 6**

제 5항에 있어서, 상기 조성물은 미생물 지질 합성 저해 활성을 가지는 병원균에 의한 감염 예방 또는 치료용 사료 조성물.

**청구항 7**

제1항 또는 제 2항의 화합물 및 농약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 감염 예방 또는 치료용 농약 조성물.

**청구항 8**

제1항 또는 제 2항의 화합물을 유효성분으로 포함하는 향균 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 신규한 항생활성 화합물 및 그 화합물을 포함하는 항생 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 미생물 지질합성을 저해하는 화합물 및 그 화합물의 용도에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 전세계적으로 감염성 질병을 치료하기 위해 항생제를 사용하는 것이 지난 수 십년간 현저히 증가하였다. 1954년에, 미국에서만 이백만 파운드의 항생제가 생산되었다. 오늘날, 그 수치는 오천만 파운드를 넘어섰다. 중앙 질병 통제 센터(CDC)에 따르면, 사람들은 연간 2억 3천 5백만개의 항생제를 소비하고 있는 실정이다.

[0003] 항생제의 만연된 남용 또는 과용으로 항생제 내성이 길러지고 있으며, 이는 심각한 공중 위생 문제에 기여한다. 항생제 내성은 감염을 야기하는 박테리아가 감염을 중지하고자 사용한 항생제에 의해 구제되지 않을때 생긴다. 박테리아는 살아남게 되고 증식하여 더 해로워진다. 예를 들어, 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)는 역학적으로, 반코마이신 항생제에 만족할만하게 반응하는 병원으로부터 감염되는 주 요인이다. 그러나, 최근 많은 스타필로코쿠스 아우레우스 균주가 반코마이신에 내성이 있는 것으로 나타났다. 더우기, 부분적으로 항생제에 대한 세균 내성때문에 결핵과 같은 일부 전염성 질병의 사망율이 다시 증가하고 있다.

[0004] 항생제는 세균 감염을 치료하기 위해 치료적으로 사용되고 있다. 그의 작용 기전에 따라 분류되는 다수 타입의 항생제가 현재 이용되고 있다. 알려진 타입의 항생제에는, 예컨대 세포벽 합성 저해제, 세포막 저해제, 단백질 합성 저해제 및 DNA 또는 RNA 합성에 영향을 미치거나 이에 결합하는 저해제가 포함된다.

[0005] 베타 락탐 항생제와 같은 세포벽 합성 저해제는 일반적으로 세균성 펩티도글리칸의 일부 합성 단계를 저해한다. 페니실린은 일반적으로 비내성 연쇄구균(*streptococcus*), 임균(*gonococcus*) 및 포도상구균(*staphylococcus*)에 효과적이다. 아목시실린 및 암피실린은 그람-음성균에 광범한 스펙트럼을 나타낸다. 세팔로스포린이 외과적 예방조치 및 그람-음성균에 대한 페니실린 대체물로 일반적으로 사용되고 있다. 모노박탐은 앨리지성 개체 치료에 일반적으로 유용하다.

[0006] 세균-관련 질병 및 장애 치료에 사용하기에 적합한 다수의 항생제가 예컨대 The Physician's Desk Reference(PDR), Medical Economics Company(Montvale, NJ), (53rd Ed.), 1999; Mayo Medical Center Formulary, Unabridged Version, Mayo Clinic(Rochester, MN), January 1998; Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, (11th Ed. ), Merck & Co., Inc.(Rahway, NJ), 1989; University of Wisconsin Antimicrobial Use Guide, <http://www.medsch.wisc.edu/clinsci/5amcg/amcg.html>: Introduction on the Use of the Antibiotics Guideline, of Specific Antibiotics Classes, Thomas Jefferson University, [http://jeffiine.tju.edu/CWIS/OAC/antibiotics\\_guide/intro.html](http://jeffiine.tju.edu/CWIS/OAC/antibiotics_guide/intro.html)에 공지되고 개시되었다.

[0007] Xoo0880인, fabD는 Xoo의 가장 중요한 약물 타겟 효소 중 하나이다. FabD 유전자는 Malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase (MCAT) 효소(EC 2.3.1.39)를 발현한다. 이 단백질은 박테리아의 타입 II 지방산 합성에서 malonyl-ACP 중간체를 형성하는 홀로-아실 운반 단백질에 말로닐 부위를 전달한다 (Ruch, F. E., and Vagelos, P. R. (1973). *J Biol Chem* **248**, 8086-94.). 이 중간체인 malonyl-ACP는 지방산 합성의 연장 단계에서 두개의 탄소를 제공한다. 지방산 합성(FAS)은 생명체의 생존에 필수적이다 (Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C. O., and Cronan, J. E., Jr. (1993). *Microbiol Rev* **57**, 522-42.; White, S. W., Zheng, J., Zhang, Y. M., and Rock (2005). *Annu Rev Biochem* **74**, 791-831.), MCAT는 아실 체인의 길이가 탄소 두개단위로 연장되는 것을 돕는다. 또한 MCAT는 아실-ACP 싸이오에스테르를 형성하여 tetracyclines 및 erythromycins 과 같은 2차 대사산물의 가장 큰 부문 중 하나를 생산하는 생산하는 폴리케타이드 생합성에 관여하는 것으로 보고되었다 (Keatinge-Clay, A. T. 등 (2003). *Structure* **11**, 147-54.; Summers, R. G. 등 (1995). *Biochemistry* **34**, 9389-402.). 따라서, FAS 과정에서 관여하는 효소들중 박테리아 대사 활성에서 MCAT는 필수적인 효소로 간주되고, 항박테리아 약물의 개발을 위한 잠재적인 약 타겟으로 이용된다 (Campbell, J. W. and Cronan, J. E. Jr. (2001). *J Bacteriol.* **183**, 5982-90.; Miesel, L., J. Greene, and T.A. Black. (2003). *Nature.* **4**, 442-456.; White, S. W. 등 (2005). *Annu Rev Biochem* **74**, 791-831.).

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

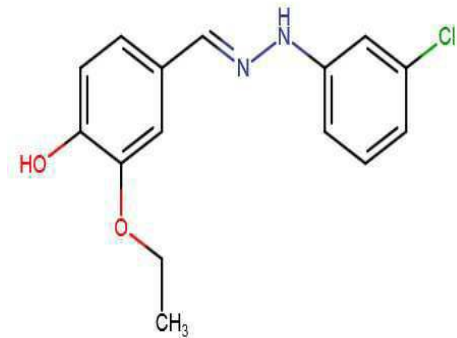
[0008] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 항생활성을

가지는 화합물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 화학식 1 의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 제공한다.



[0011]

[0012] [화학식 1]

[0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 말로닐-CoA: 아실 캐리어 프로틴 트랜스아실레이즈(MCAT) 활성을 저해하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0014] 또 본 발명은 상기 본 발명의 화학식 1 의 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 병원균에 의한 감염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 화학식 1 의 화합물 및 사료학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 병원균에 의한 감염 예방 또는 치료용 사료 조성물을 제공한다.

[0016] 또 본 발명은 상기 본 발명의 화학식 1 의 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 감염 예방 또는 치료용 농약 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 미생물 지질 합성 저해 활성을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0018] 또한 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제, 담체, 희석제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명에서 사용가능한 담체로는 리포솜, 다당, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체성아미노산, 및 아미노산 공중합체와 같이 천천히 대사되는 거대분자를 들 수 있다. 예를 들면, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 포스페이트 및 설페이트와 같이 무기산의 염; 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트 및 벤조에이트와 같은 유기산의 염과 같은 약제학적으로 허용가능한 염; 물, 염수, 글리세롤 및 에탄올과 같은 액체, 및 수화제, 유화제 또는 pH 완충 물질과 같은 보조적 물질을 사용할 수 있다.

[0020] 약제학적으로 허용가능한 담체에 관해서는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, 1991]에 기재되어 있다.

[0021] 또한, 상기 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 제제, 바람직하게는 화합물 의약품의 투여에 유용한 제제 형태로 제형화시켜 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 경구, 또는 피부, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 수막강내, 심실내, 폐, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 소화관내, 국소, 설하, 질내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 세균 치료에 유효한 화합물 용량은 1일 수용체 체중 1kg 당 약 0.1 내지 50 0mg 또는 0.1 내지 200 mg, 보다 일반적으로 수용체 체중 1 kg 당 1일 0.1 내지 약 100mg 이다. 약제학적으로 허용되는 염 및 프로드럭의 유효용량 범위는 전달되는 모 화합물의 중량에 기초하여 산출될 수 있다. 염 또는 프로드럭이 자체적으로 활성을 나

타내는 경우, 유효 용량은 염 또는 프로드럭의 중량을 이용하여 상기 언급된 바와 같이, 또는 당업자들에 공지된 다른 수단에 의해 추정될 수 있다.

- [0023] 경구 치료 투여의 경우, 활성 화합물은 하나 이상의 부형제와 배합되어 섭취가능한 정제, 협측 정제, 트로키, 캡셀, 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 와퍼 등의 형태로 사용될 수 있다.
- [0024] 정제, 트로키제, 환제, 캡셀제 등은 하나 이상의 하기 성분을 함유할 수 있다: 결합제, 예를 들어 미정질 셀룰로즈, 트라가칸트검, 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴; 부형제, 예를 들어 인산이칼슘, 전분 또는 락토스; 봉해제, 예를 들어 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산, 프리모겔(Primogel) 등; 윤활제, 예를 들어 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로테스(Sterotes); 활제, 예를 들어 콜로이드성 이산화규소; 감미료, 예를 들어 수크로스, 프럭토스, 락토스, 사카린 또는 아스파탐; 향미제, 예를 들어 페퍼민트, 메틸살리실레이트, 윈터그린 오일 또는 체리향; 및 펩티드 향균제, 예를 들어 엔부비르타이드(Fuzeon™).
- [0025] 단위 제형이 캡셀제인 경우, 이는 상기 타입의 물질 이외에, 식물성 오일 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 액체 담체를 함유할 수 있다. 기타 다양한 물질이 코팅제로 또는 고체 단위 제형의 물리적 형태를 변경시키기 위하여 존재할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 약제학적 조성물은 직장 투여용으로 적합한 제제로 제조, 포장 또는 시판될 수 있다. 이러한 조성물은 예를 들어, 좌제, 정제 관장 제제 및 직장 또는 결장 세척용 용액 형태일 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 질 투여용으로 적합한 제제로 제조, 포장 또는 시판될 수 있다. 이러한 조성물은 예를 들어, 좌제, 함입 또는 코팅된 질 삽입용 물질, 예컨대 탐폰, 세척 제제, 질 세척용 용액 형태일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 약제학적 조성물은 눈에 투여하기에 적합한 제제로 제조, 포장 또는 시판될 수 있다. 국소 투여의 경우, 본 발명의 화합물은 순수한 형태, 즉 액체로 적용될 수 있다. 그러나, 전형적으로, 화합물은 피부과적으로 허용되는 담체와 배합된 조성물 또는 제제로서 피부에 투여될 수 있다. 유용한 고체 담체는 미분 고체, 예컨대 활석, 점토, 미결정성 셀룰로즈, 실리카, 알루미늄 등을 포함한다. 유용한 액체 담체는 물, 알콜, 글리콜, 및 두개 이상의 이들 혼합물을 포함하며, 이때 본 발명의 화합물은 임의로 비독성 계면활성제를 사용하여 유효 수준으로 용해 또는 분산될 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 농약 조성물은 다른 추가의 성분, 예컨대 농업적으로 허용되는 지지체, 담체 또는 충전제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0029] 본 명세서에서, "지지체"란 용어는, 특히 식물의 일부에 적용이 용이하도록 하기 위해 활성 물질이 결합되는 천연 또는 합성의 유기 또는 무기 물질을 나타낸다. 따라서, 이 지지체는 일반적으로 불활성이고 농업적으로 허용적이어야 한다.
- [0030] 지체는 고체 또는 액체일 수 있다. 적절한 지지체의 예에는, 점토, 천연 또는 합성 실리케이트, 실리카, 수지, 왁스, 고체 비료, 물, 알콜, 특히 부탄올, 유기 용매, 광유 및 식물성 오일 및 그 유도체가 포함된다. 상기 지지체의 혼합물도 사용될 수 있다.
- [0031] 농약 조성물은 또한 다른 추가 성분을 함유할 수도 있다. 특히, 농약 조성물은 계면활성제를 추가로 함유할 수 있다. 계면활성제는 이온성 또는 비이온성 유화제, 분산제 또는 습윤제 또는 이들 계면활성제의 혼합물일 수 있다. 이들로는 예를 들어, 폴리아크릴산염, 리그노설포산염, 페놀설포산염 또는 나프탈렌설포산염, 에틸렌 옥사이드와 지방 알콜 또는 지방산 또는 지방 아민과의 중축합물, 치환된 페놀(특히 알킬페놀 또는 아릴페놀), 설포숙신산에스테르염, 타우린 유도체(특히 알킬 타우레이트), 폴리옥시에틸화 알콜 또는 페놀의 인산 에스테르, 폴리올의 지방산 에스테르, 및 설페이트, 설포네이트 및 포스페이트 작용기를 가지는 상기 화합물들의 유도체를 들 수 있다. 활성 물질 및/또는 불활성 지지체가 수불용성이고, 적용을 위한 벡터 시약이 물인 경우, 일반적으로 적어도 하나의 계면활성제가 존재하는 것은 필수적이다. 바람직하게, 계면활성제 함량은 조성물의 5 내지 40 중량%일 수 있다.
- [0032] 추가 성분에는 또한, 예를 들어, 보호 콜로이드, 점착제, 증점제, 요변제(thixotropic agent), 침투제, 안정화제, 격리제가 포함될 수 있다. 더욱 일반적으로, 활성 물질은 통상적인 제제화 기술에 따라 임의의 고체 또는 액체 첨가제와 배합될 수 있다.
- [0033] 일반적으로, 본 발명에 따른 농약 조성물은 0.05 내지 99%(중량), 바람직하게는 10 내지 70 중량%의 활성 물질을 함유할 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따른 조성물은 에어로졸 디스펜서, 캡셀 현탁액, 냉무 농축물, 분제(dustable powder), 유화성 농축

액, 수중유 에멀전, 유중수 에멀전, 캡슐화 과립, 세립제, 종자 처리용 유동성 농축액, 가스(가압하), 가스 발생 제품, 과립, 온무 농축물, 거대과립, 미소과립, 오일 분산성 분말, 오일 혼화성 유동 농축액, 오일 혼화성 액체, 페이스트, 식물의 작은 대(plant rodlet), 건조 종자 처리용 분말, 농약으로 코팅된 종자, 가용성 농축액, 가용성 분말, 종자 처리용 용액, 현탁 농축물(유동성 농축액), 극소 용적(ultra low volume; ulv) 액, 극소 용적(ulv) 현탁액, 수분산성 과립 또는 정제, 슬러리 처리용 수분산성 분말, 수용성 과립 또는 정제, 종자 처리용 가용성 분말 및 수화제와 같은 다양한 형태로 사용될 수 있다.

[0035] 이들 조성물은 분무 또는 살포 장치와 같은 적절한 장치를 이용하여 처리될 식물 또는 종자에 직접 적용할 준비가 되어 있는 조성물뿐 아니라, 작물에 적용되기 전에 희석되어야 하는 시판용 농축 조성물도 포함한다.

[0036] 본 발명의 농약 조성물은 작물의 식물병원성균의 치료적 또는 예방적 구제뿐만 아니라 곤충의 치료 또는 예방적 구제에 사용될 수 있다.

[0037] 따라서, 본 발명의 추가적 측면에 따라, 상기 정의된 바와 같은 조성물의 유효한 비식물독성 양을 종자 처리, 잎 적용, 줄기 적용, 또는 종자, 식물 및/또는 식물의 과실 또는 식물이 성장하고 있거나 이를 성장시키고자 하는 토양 및/또는 불활성 기재(예: 유기 기재(예: 모래, 암면, 유리울, 팽창성 광물(예: 펠라이트, 질석, 제올라이트, 팽창성 점토)), 속돌, 화쇄암 물질/응회암, 합성 유기 기재(예: 폴리우레탄), 유기 기재(예: 이탄, 퇴비, 임목 폐기물(예: 코이어, 목재 섬유/칩, 나무 껍질)) 및/또는 액체 기재(예: 부유 수경 시스템, Nutrient Film Technique, Aeroponics)에 관주/점적(drench/drip) 적용(관개)을 통해 적용하는 것을 특징으로 하는, 작물의 식물병원성균을 치료적 또는 예방적으로 구제할 뿐만 아니라 곤충을 치료 또는 예방적으로 구제하는 방법이 제공된다.

[0038] "유효한 비식물독성 양" 이란 표현은 작물에 존재하거나 그에 출현하기 쉬운 해충 및/또는 질병을 구제하거나 박멸하기에 충분하면서, 상기 작물에 어떤 상당한 식물독성 증상도 수반하지 않는 본 발명에 따른 조성물의 양을 의미한다. 이러한 양은 퇴치 또는 구제할 해충 및 질병, 작물의 종류, 기후 조건 및 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 화합물에 따라 광범위하게 변할 수 있다. 상기 양은 당업자들이 정할 수 있는 것으로, 조직적인 현장 실험으로 결정할 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 처리 방법은 번식 물질, 예컨대, 괴경 또는 근경의 처리뿐만 아니라, 종자, 묘목 또는 이식 묘목 및 식물 또는 이식 식물의 처리에 유용할 수 있다. 상기 처리 방법은 또한 뿌리의 처리에도 유용할 수 있다. 본 발명에 따른 처리 방법은 또한 관련 식물의 본체, 줄기 또는 자루, 잎, 꽃 및 과실과 같은 식물의 지상 부위를 처리하는 데에도 유용할 수 있다.

[0040] 본 발명의 방법에 의해 보호될 수 있는 식물로는 목화; 아마; 덩굴 식물(vine); 과실 또는 채소 작물, 묘목, 주요 작물, 예컨대 벼과 종(Graminae sp.)(예를 들어 옥수수, 잔디 또는 밀, 쌀, 보리 및 라이필과 같은 곡물), 꽃, 원예 및 산림 작물; 뿐 아니라 이들 작물의 유전자적으로 변형된 상동체가 언급될 수 있다.

[0041] 또한 본 발명의 화합물 또는 그의 염을 첨가하여 이루어지는 사료 조성물은, 포유류, 조류, 파충류, 양서류, 어류 등의 동물, 바람직하게는 포유류에 대한 사료로서 사용된다. 예를 들면, 본 발명의 사료는 개, 고양이, 쥐 등의 애완동물용 사료, 소, 돼지 등의 가축용 사료, 닭, 칠면조 등의 가금용 사료, 도미, 방어 등의 양식어용 사료 등으로서 사용되고, 바람직하게는 애완동물용 사료 또는 가축용 사료로서 사용된다.

[0042] 본 발명의 사료는 사료 원료에 본 발명의 화합물 또는 그의 염을 적절하게 배합하여 만들 수 있다. 사료 원료로서는 곡물류, 조강류, 식물성 유박류, 동물성 사료 원료, 기타 사료 원료, 정제품 등을 들 수 있다.

[0043] 곡물류로서는, 예를 들면 마이로, 밀, 보리, 귀리, 호밀, 현미, 메밀, 조, 수수, 피, 옥수수, 대두 등을 들 수 있다.

[0044] 조강류로서는, 예를 들면 쌀겨, 탈지 쌀겨, 밀기울, 말분, 밀, 배아, 보리겨, 스크리닝, 펠렛, 옥수수겨, 옥수수 배아 등을 들 수 있다.

[0045] 식물성 유박류로서는, 예를 들면 대두박, 콩가루, 아마박, 면실박, 낙화생 박, 홍화박, 야자박, 팜박, 호마박, 해바라기박, 유채박, 케이폭박, 겨자박 등을 들 수 있다.

[0046] 동물성 사료 원료로서는, 예를 들면 어분(북양 밀, 수입 밀, 홀 밀, 연안 밀), 피쉬솔블, 육분, 어골분, 혈분, 분해모, 골분, 가축용 처리 부산물, 페더 밀, 누에, 탈지 분유, 카제인, 건조 유장 등을 들 수 있다.

[0047] 그 밖의 사료 원료로서는 식물 경엽류(알팔파, 헤이큐브, 알팔파잎 분말, 유사 아카시아 분말 등), 옥수수 가공



공업부산물(콘 글루텐, 밀, 콘 글루텐 피드, 콘스테이프리카 등), 전분 가공품, 설탕, 발효 공업 산물(효모, 맥주박, 맥아근,알코올박, 장유박 등), 농산 제조 부산물(감귤 가공박, 두부박, 커피박, 코코아박 등), 그 외(카사바, 잠두콩, 구아밀, 해조, 크릴, 스피롤리나, 클로렐라, 광물 등) 등을 들 수 있다.

[0048] 정제품으로서의 단백질(카제인, 알부민 등), 아미노산, 당질(전분, 셀룰로오스, 슈크로우스, 글루코오스 등), 미네랄,비타민 등을 들 수 있다.

**발명의 효과**

[0049] 본 발명을 통해서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명자들은 ~ ug/ml 범위에서 박테리아 세포 성장을 저해하는 1종의 리드 화합물을 발견하였다.

**도면의 간단한 설명**

[0050] 도 1은 타입 II 박테리아 지방산 합성 경로를 나타낸 그림이다.  
 도 2a는 정제된 fabD (Xoo0880)의 SDS-PAGE 사진이고, 2b는 0.1 M CHES pH9.0, 1.5M NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 및 0.2M NaCl에서 성장한 결정 사진이다.  
 도 3a는 XoMCAT의 전체 구조이고, 3b는 그것의 활성 부위의 상세도이다.  
 도 4는 특정 타겟 단백질에 대한 길항제 약물을 검색하기 위한 VLS 실험을 도식화한 그림이다.  
 도 5는 VLS로부터 유래한 선택된 화합물을 가지고 박테리아 세포 성장 저해 분석의 과정을 나타낸 그림이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0051] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0052] 제조예: 본 발명의 화합물의 제조

[0053] 본 발명에 사용된 화합물들은 유럽 소재 Enamine Ltd(7 Deer Park Drive, Ste. M-3 Monmouth Jct, NJ 08852, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 해당 회사 web site : <http://www.enamine.net/>이다.

[0054] 실시예 1: Xanthomona sorvzae pv. orvzae(Xoo)로부터 유래한 XoMCAT의 클로닝, 발현, 정제, 결정화, 결정 구조 결정

[0055] 클로닝

[0056] Xoo0880의 FAD 코딩 서열을 주형으로 박테리아 세포 (Xoo KACC10331 균주) 유전체를 사용하여 중합효소 연쇄반응을 통하여 증폭하였다. 올리고뉴클레오타이드 프라이머 서열들은 기존 보고된 유전자 서열에 기초하여 고안되었다 (Lee, B. M., 등 (2005) *Nucleic Acids Res* **33**, 577-86.). 포워드 및 리버스 프라이머는 각각: 5'GGG GGC **CAT ATG** ACC GAA TCC ACT CTC GCC TTC A-3 및 5'-GGG GGG **GGA TCC** TCA GTG GCC CCA CGC GTC GAG A-3' 으로 제작되었다. *NdeI* 및 *BamHI* 제한 부위는 볼드체로 표시하였다. 그 PCR 앰플리콘을 *NdeI* 및 *BamHI*로 이중 처리하고 발현 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여 pET11a 벡터(Novagen)에서 *NdeI* 부위 앞에 tobacco etch virus (TEV) 프로테아제 절단 부위 및 6xHis의 부가 잔기를 가지게 고안된 변형된 pET11a 벡터(His-TEV-pET11a)로 라이게이션하였다.

[0057] 과발현 및 정제

[0058] Xoo0880의 코딩 서열을 포함하는 His-TEV-pET11a 발현벡터를 *E.coli* BL21(DE3)에 넣었다. 세포를 50µg /ml 앰피실린을 포함하는 Luria-Bertani 배지에서 OD<sub>600</sub> 가 0.5에 도달할 때까지 37°C에서 성장시켰다. 단백질 발현은 배양액에 0.5 mM Isopropyl-베타-D-thiogalactopyranoside를 첨가하여 유도되었다. 유도 후에, 그 세포들을 같은 온도에서 추가적으로 16시간 배양하였다. 배양된 대장균을 277K에서 6,000 rpm에서 20분간 원심분리(Vision VS24-SMTi V5006A rotor)하여서 수집하였다. 그 후 수집된 대장균을 온도를 낮춘 세포 파쇄용 완충용액 A [25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10mM Imidazole]에 재부유하고 얼음 상에서 초음파(Sonomasher, S & T



Science, Korea)를 사용하여 과쇄 하였다. 그 후 세포 추출물을 얻기 위해서 그 과쇄액을 277K, 12,000 rpm에서 30분간 원심분리 하였다 (Vision VS24-SMTi V508A rotor). 전체 발현된 Xoo0880의 단지 10%가 수용성 이었다 (도시 안함). 친화 정제법을 이용하기 위해 수용성 fabD를 포함하는 상등액을 Ni-NTA 레진(Novagen)에 로딩하였다. 친화 정제는 제조업자의 프로토콜에 따라서 4°C에서 수행되었다. 그 다음에 6xHis-tag이 있는 fabD 단백질을 200 mM 이미다졸을 포함하는 과쇄용 완충용액 A를 사용하여 용출하고, 6XHis-tag을 제거하기 위해서 4°C에서 TEV 프로테아제로 하룻밤동안 처리하였다. 이렇게 처리된 단백질 용액을 4°C에서 완충용액 B [25 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM NaCl]를 이용하여 6시간 동안 투석을 하고, UNO6 Q 컬럼(Bio-Rad)을 이용하여 추가적으로 정제 하였다. SDS-PAGE를 사용하여 정제된 단백질의 순수도를 분석하였다(도 2). 그 정제된 단백질을 7 mg ml<sup>-1</sup>로 농축하였고 결정화 과정에 사용하였다.

[0059] 결정화 및 X-레이 회절 데이터 수집

[0060] XoMCAT의 결정화는 Crystal screen HT, Index HT, 및 Salt Rx HT (Hampton Research)와 같은 여러 스크리닝 키트를 사용하여 자동화된 피펫팅 시스템인 Hydra II e-drop (Matrix)를 통해서 수행되었고, 283K에서 고효율 [high throughput(HT)] 결정 스크리닝이 시작되었다. 처음에는 매우 얇은 바늘 모양 결정을 Wizard G-5 조건 (0.1 M CHES pH9.5, 1.25M NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 및 0.2M NaCl)로 얻었고, 변형된 조건 (0.1 M CHES pH9.0, 1.5M NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 및 0.2M NaCl)에서 최적화 되었다. 행잉드롭 (hanging drops) 방법을 이용하여 재생되었으며, 일주일동안 결정들이 만들어졌다. 성장이 끝난 결정을 결정화 조건에 부동액 20% (v/v) 글리세롤을 첨가한 후 액체 질소에서 100K로 냉동하였고, 데이터 수집에 사용하였다. 일본 포톤 팩토리의 빔라인 17A에서 ADSC Quantum 270 CCD 디텍터를 사용하여 1.9 해상도까지 결정 데이터를 수집하였다. 데이터 세트를 통합하여서 DENZO 및 SCALEPACK를 사용하여 계산 하였다(Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997). *Methods Enzymol* **276**, 307-326.). 오토-인덱싱과정을 통해 P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>의 결정 공간 그룹과 단위 셀 파라미터 a=41.4, b=74.6, c=98.5가 추론되었다.

[0061] XoMCAT의 결정 구조 및 그것의 활성부위 잔기는 도 3에 도시하였다. XoMCAT의 전체 구조는 더 큰 도메인과 더 작은 도메인인 두 도메인으로 구성되고 안정적으로 폴딩되었다. 그 활성 부위는 이들 도메인 사이에 협곡에 위치한다. 더 큰 도메인은 DSSP 프로그램 (Kabsch, W. and Sander, C. (1983). *Biopolymers* **22**, 2577-637.)으로부터 계산된 12585Å<sup>2</sup>의 물분자가 접근 가능한 표면적을 가진 14개의 알파-나선 구조 및 8개의 베타-선형구조로 구성되어 있다. 뉴클레오피릭 활성화 잔기인 Ser-94은 더 큰 도메인의 알파-나선 구조 및 베타-선형구조 사이에 위치한 샤프 턴에 위치하였고 다른 활성 부위 잔기 Gln 13, Arg 119 및 His 203은 뉴클레오피릭 잔기 근처에 위치한다.

[0062] 실시예 2: 타겟 효소 XoMCAT에 대한 버츄얼 라이브러리 스크리닝(VLS) 과정

[0063] Xoo0880 (XoMCAT)은 GlaxoSmithKline (GSK)에 기반한 베헤일마름병에 대한 가능성있는 타겟된 유전자 중 하나이므로, 고효율(HT) 버츄얼 라이브러리 스크리닝(VLS, 도 4)을 통해 XoMCAT 효소의 기질 결합부위에 대한 길항적 약물 리드 화합물을 검색하였다.

[0064] 약물 스크리닝을 위해 ICM Molsoft 모델링 슈트(suite)에 있는 1천8백만 화합물 데이터베이스를 이용하여 컴퓨터 모의실험인 VLS를 수행하였다. VLS중 Lipinski 공식을 통해 찾아진 화합물 데이터베이스에 존재하는 각각의 유연성을 갖는 구조의 기질을 ICM을 이용해 XoMCAT의 기질 결합 포켓 그리드로 도킹하였고, 복합체의 퀄리티를 반영한 스코어를 할당하였다. 각 기질 결합 결과의 재생성을 체크하기 위하여 동시에 병렬로 3회 수행하였다. 탑 스코어를 갖는 1991개의 화합물을 선택하여 각각의 그것의 복합체를 형태 상보성(shape complementarity), 수소 결합 네트워크 및 리간드의 유연성(flexibility)과 같은 계수로 가시화 (수치화) 하여 조사하였다. 실험적인 분석을 통해 특성화하기 위하여 상기 최종 선택 단계에 기초하여서 500 개의 화합물을 얻었다.

[0065] 실시예 3:Xoo, E.coli, 및 pseudomonas,에 대한 합성된 화학적 화합물의 박테리아 세포 성장 저해 분석 및 각 효과적인 스크리닝된 화합물의 MIC (최소 저해 농도) 측정

[0066]

하룻밤 동안 배양된 3 ml의 Xoo를 100 ml의 NB 배지에 접종하였다. 박테리아 배양액을 OD<sub>600</sub>가 0.6에 도달할 때까지 배양하였다. 150 μl의 박테리아 배양을 VLS로부터 검색된 1mM의 스크리닝된 화합물을 포함하는 96 웰 ELISA 플레이트로 옮겼다. 화합물을 30 mM 농도의 스톱 화합물로 용해하는데 DMSO를 사용하였다. DMSO 농도는 모든 박테리아 성장 분석에 대하여 5% 이하로 유지하였고, 음성 대조군은 단지 동일한 농도의 DMSO를 사용하였다. 그 플레이트를 연속 진탕을 하면서 28에서 배양하고 흡광도 600 nm에서 0, 3, 6, 9, 및 12 시간의 일정한 간격으로 측정하였다. 그 화합물의 MIC<sub>50</sub> 값을 측정하기 위하여 50% 이상의 Xoo 성장을 저해하는 화합물들을 선택하였다.

[0067]

MIC<sub>50</sub> 방법(마이크로타이터 플레이트-기반 항박테리아 분석)

[0068]

하룻밤 동안 배양된 3 ml의 Xoo를 100 ml의 NB 배지에 접종하였다. 박테리아 배양액을 0.5 McFarland 스탠다드의 세포 밀도까지 배양하였다. 그 배양액을 10배 희석하고, 150μl의 희석된 배양액을 멸균된 96-웰 클리어 플랫바텀 플레이트에 분액 하였다. 높은 박테리아 세포 성장 저해 활성을 가지는 선택된 화합물을 연속적으로 희석하여 600 M부터 9.5 M까지의 농도로 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 동일한 농도의 DMSO만을 가지는 박테리아 배양액을 음성 대조군으로 사용하였다. 28°C에서 이 플레이트를 배양하고, 20시간 후에 OD<sub>600</sub> 측정을 수행하였다. 박테리아 성장의 저해 퍼센트는 아래와 같은 식에 의하여 계산되었다.

[0069]

$$\text{저해 퍼센트} = 100 \times (OD_{nc} - OD_{tc}) / (OD_{nc} - OD_{pc})$$

[0070]

[OD<sub>nc</sub> : 음성 대조군의 OD<sub>600</sub>, OD<sub>tc</sub> : 테스트 화합물의 OD<sub>600</sub>, OD<sub>pc</sub> : 양성대조군(공지된 저해제)의 OD<sub>600</sub>].

[0071]

MIC<sub>50</sub> 값들을 50%의 박테리아 세포 성장을 저해하는 최소 화합물 농도로 결정하였다.

[0072]

표 1은 박테리아 세포 성장 저해 분석으로부터 유래한 리드 화합물의 MICs에 관한 표이다.

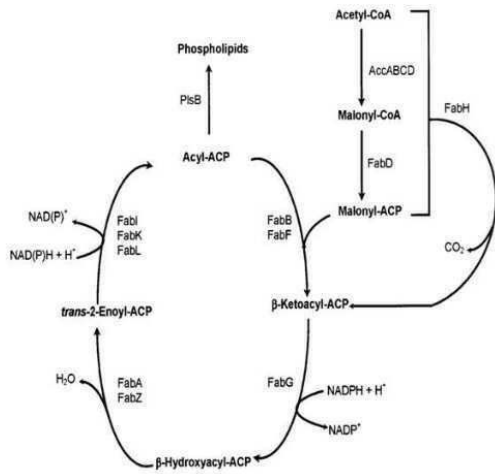
표 1

[0073]

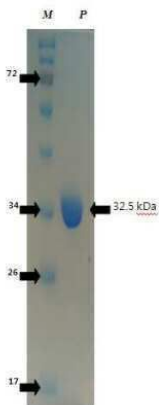
ID	구조	MIC <sub>50</sub> (μg/mL)
T0506-8178		10

도면

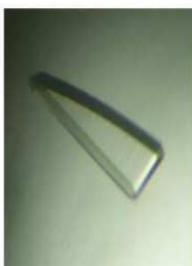
도면1



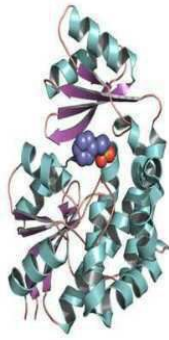
도면2a



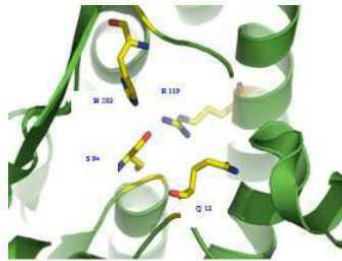
도면2b



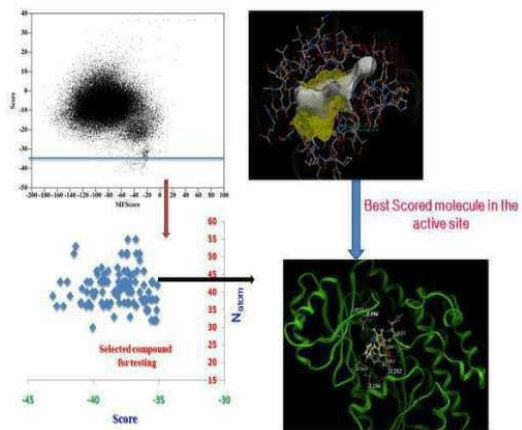
도면3a



도면3b



도면4



도면5

